

Клінічні оцінки серологічних методів діагностики сифілісу

Захаров С. В., Захаров В. К.

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Проведено порівняльний аналіз специфічності і чутливості трепонемних і нетрепонемних тестів у хворих на первинний, вторинний, ранній прихований сифіліс і у пацієнтів, що раніше лікувалися з приводу сифілісу з негативними результатами нетрепонемних тестів. Встановлено, що найбільшу діагностичну цінність має імунний блотинг, особливо при ранньому прихованому сифілісі. При первинному сифілісі діагностичні можливості імунного блотингу поступаються реакції флюоресценції.

Ключові слова: вторинний сифіліс, нетрепонемний тест, первинний сифіліс, ранній прихований сифіліс, трепонемний тест.

Актуальність проблеми діагностики прихованого сифілісу визначається такими основними напрямками:

- по-перше, соціальною значимістю сифілітичної інфекції, що обумовлене збільшенням питомої ваги прихованого сифілісу [5, 11];

- по-друге, встановлення остаточного діагнозу прихованого сифілісу, як раннього так і пізнього, – завдання досить складне; у зв'язку із несвоєчасним встановленням діагнозу на ранній стадії інфекції, відзначається збільшення випадків пізніх форм сифілісу, у тому числі і сифілісу нервової системи, а також вродженого сифілісу [1, 2, 6];

- по-третє, це патоморфоз не тільки клінічних симптомів сифілітичної інфекції, а й деякі особливості серологічних реакцій, а саме низькі потенції сироватки крові та хибно позитивні результати дослідження серологічних реакцій [3, 10, 14].

Для лабораторної діагностики сифілісу застосовуються прямі і непрямі методи дослідження. Серед прямих методів дослідження найбільш перспективними вважається імуноблотинг [7, 12, 13]. Результати, отримані при дослідженні кожної з серологічних реакцій на сифіліс, залежать від вмісту у сироватці крові досліджуваного специфічних антитіл до антигенних детермінант збудника сифілісу – *Treponema pallidum* [17].

Разом з тим, не всі реакції, які застосовуються для діагностики сифілісу, є досить чутливими і специфічними, що призводить до діагностичних помилок та несвоєчасного призначення лікування. Усе це обумовлює необхідність удосконалення методів діагностики та визначення їх місця та значення серед загальноприйнятих методів дослідження [5, 8].

Одним з найбільш перспективних методів діагностики сифілісу є метод імуноблотингу. Імуноблотинг є досить високоспецифічним і чутли-

вим референтним методом, який може підтвердити діагноз сифілісу у пацієнтів з позитивними або невизначеними результатами досліджень, отриманими у тому числі за допомогою таких реакцій, як РПГА або ІФА. За кордоном, з метою проведення диференційного діагнозу між прихованим сифілісом і хибно позитивними реакціями на сифіліс, активно використовують імуноблотинг [15, 16].

Метод імуноблотингу є одним із варіантів імуноферментного аналізу, що полягає у одночасному виявленні:

- антитіл до рекомбінованих антигенів;
- антитіл до найбільш імуногенних детермінант білої трепонеми.

Метод має досить високу чутливість і специфічність, а саме [16]:

- чутливість – 99-100 %;
- специфічність – 99,3-99,5 %.

Такі результати обумовлені тим, що за допомогою електрофорезу розділяють білки, гліко- і ліпопротеїди та максимальної специфічності імунні сироватки, які використовуються для детекції моноклональних антитіл.

Метод імуноблотингу дозволяє виявити антитіла у сироватці крові та визначити антигени, що їм відповідають, у залежності від їх молекулярної маси (15, 17, 47, КДа).

При порівнянні діагностиків, що містять *IgM* та *IgG*, більшість дослідників віддає перевагу саме *IgG*-імуноблотингу, тому що він більш чутливий на всіх стадіях сифілісу [15].

Серед дерматовенерологів України ставлення до даного методу ще не сформувалося, оскільки ще не встановлені діагностичні можливості методу для хворих на ранні форми сифілісу, не розроблені клінічні рекомендації для застосування даного методу.

Відомо, що вже на первинній стадії інфікування у крові хворих на сифіліс з'являється велика кількість антитіл до різних структур білої трепонеми. Специфічні антитіла у сироватці крові хворого можна визначити навіть у інкубаційному періоді, але частіше за все їх можна визначити після прояву перших клінічних симптомів сифілісу.

Дослідження, проведені за кордоном, свідчать, що кількість поліпептидів, що вступили в реакцію з неадсорбованою сироваткою крові хворих, від первинного до вторинного сифілісу збільшується.

Відомо, що низькомолекулярні білки білої трепонеми, особливо *Tr* 47 відносять до антигенів, які пов'язують пеніцилін та є індуктором антитіл як у первинному, так і вторинному періодах сифілісу. *Tr* 15 – це ліпопротеїди, і якщо виявляють у сироватці крові антитіла до нього, то це дозволяє з великою вірогідністю діагностувати первинний або вторинний сифіліс. У вторинному періоді найбільш активно утворюються антитіла до мембранного білка *Tr* 17.

Найбільш імунореактивними білками мембрани *T. pallidum* є 15,17,47 КДа. Більшість дослідників при порівнянні *IgM* та *IgG* діагностикумів віддає перевагу *IgG*-імуноблотингу, для якого властива більш висока чутливість на всіх стадіях сифілісу [8].

За інформацією деяких дослідників, чутливість методу при первинному, вторинному і ранньому прихованому сифілісі становила 100 %, а специфічність методу – 98 % [13].

Мета дослідження – клінічна оцінка чутливості і специфічності імуноблотингу у хворих на ранні форми сифілісу.

Матеріали і методи. До дослідження було включено:

- 215 хворих на ранні форми сифілісу (115 жінок і 100 чоловіків, середній вік яких – $31,5 \pm 0,8$ року);

- 50 порцій сироваток крові здорових осіб з негативними РЗК і РМП;

- 50 пацієнтів, які раніше хворіли на ранні форми сифілісу та були зняті з диспансерного обліку у зв'язку з негативацією КСР у встановлені діючими нормативними документами МОЗ України терміни.

Критерії виключення з дослідження:

- вагітність;

- захворювання на туберкульоз, ВІЛ / СНІД, вірусні гепатити;

- пацієнти, які хворіли на сифіліс вдруге;

- вік до 18 років та понад 55 років.

Діагноз різних форм сифілісу було встановлено таким чином:

- діагноз первинного сифілісу – у 30 (14 %) осіб, серед них 11 жінок і 19 чоловіків;

- діагноз вторинного сифілісу – у 45 (21 %) осіб, серед них 27 жінок і 18 чоловіків;

- діагноз раннього прихованого сифілісу – у 140 (65 %) осіб, серед них 72 жінки і 68 чоловіків.

Для проведення досліджень використовувались:

- РМП (реакція мікропреципітації);

- РЗК (реакція зв'язування комплексу з кардіоліпіновим та трепонемним антигенами);

- РІФ (реакція імунофлюоресценції у двох модифікаціях – РІФ-200 і РІФ-абс);

- ІФА (імуноферментний аналіз з визначенням *IgM* та *IgG* окремо);

- ІБ (імуноблотинг – метод *ELISA*)

Результати та їх обговорення. Результати вивчення чутливості нетрепонемних і трепонемних тестів у обстежених пацієнтів наведені у Табл. 1-3.

Таблиця 1 - Чутливість нетрепонемних і трепонемних тестів

Групи пацієнтів	Кількість пацієнтів у групі, <i>n</i>	РМП	РЗК		РІФ абс.	РІФ 200	ІФА	Імуно-блотинг	РПГА
			Кл. <i>Ag</i>	<i>Tr Ag</i>					
		%%							
Сифіліс первинний	30	90,1±2,3	70,1±3,2	88,4±2,1	97	98	38,4±2,1	100	95,7±2,2
Сифіліс вторинний	45	100	99,3±1,5	100	100	100	100	100	100
Сифіліс прихований ранній	140	93,2±1,4	92,4±2,0	96,1±1,4	98,1±1,3	96,8±1,4	98,1±1,0	100	97,1±1,0
Особи, які раніше хворіли на сифіліс (з негативним РМП і РЗК)	50	-	-	-	48,3±2,0	57,4±2,3	60,1±2,1	65,1±1,8	58,1±1,7

У хворих на первинний сифіліс, як видно з Табл. 1, чутливість тестів була такою:

- найменш чутливою з усіх реакцій була РЗК з кардіоліпіновим антигеном – реакція позитивна у $(70,1 \pm 3,2) \%$;

- більш чутливими були:

1) РМП – $(90,1 \pm 2,3) \%$;

2) РЗК з трепонемним антигеном – $(88,4 \pm 2,1) \%$;

- найбільш чутливими були:

1) РІФ-абс – 97% ;

2) РІФ-200 – 98% ;

3) РПГА – $(95,7 \pm 2,2) \%$.

Чутливість імуноблотингу була достовірною вищою, ніж чутливість РЗК, РМП, РПГА і ІФА. Як видно з Табл. 1, чутливість імуноблотингу при первинному сифілісі – 100% , перевищуючи чутливість усіх тестів, окрім РІФ. Чутливість усіх нетрепонемних і трепонемних тестів, які нами застосовувались у хворих на вторинний сифіліс, у тому числі й імуноблотингу, була позитивною у 100% (тобто їх чутливість становила 100%).

Отримані нами результати свідчать про недоцільність застосування імуноблотингу, РПГА та ІФА при діагностиці цієї форми сифілісу.

У хворих на ранній прихований сифіліс чутливість тестів становила:

- РМП – $(93,2 \pm 1,4) \%$;

- РЗК з кардіоліпіновим антигеном – $(92,4 \pm 2,0) \%$;

- РЗК з трепонемним антигеном – $(96,1 \pm 1,4) \%$;

- трепонемних реакцій:

1) РІФ-абс – $(98,1 \pm 1,3) \%$;

2) РІФ-200 – $(96,8 \pm 1,4) \%$;

3) РПГА – $(97,1 \pm 1,0) \%$;

4) ІФА – $(98,1 \pm 1,0) \%$.

Позитивні результати ІБ були у 100% хворих на ранній прихований сифіліс. Потрібно звернути увагу на те, що позитивні результати імуноблотингу були отримані навіть у хворих із слабо позитивними результатами інших тестів. Отримані нами результати дослідження дозволяють стверджувати, що чутливість імуноблотингу при цій формі сифілісу становить 100% і перевищує чутливість інших тестів, як нетрепонемних, так і трепонемних.

Метод імуноблотингу дозволяє дати оцінку кожному із рекомбінантних білків у формуванні загального результату реакції. Було використано кількісний аналіз імуноблотингу за індексом антитіл:

- *Tr IgM*:

1) $R < 0,8$ – негативний результат;

2) $R = 0,8-1,1$ – сумнівний результат;

3) $R > 1,1$ – позитивний результат;

- *Tr IgG*: *Tr* 15 кДа, *Tr* 17 кДа, *Tr* 47 кДа:

1) $R < 0,8$ – негативний результат;

2) $R = 0,8-1,1$ – сумнівний результат;

3) $R > 1,1$ – позитивний результат.

Як видно з Табл. 2, метод ІБ є досить чутливим при діагностиці первинного і вторинного сифілісу та раннього прихованого сифілісу. Максимальні індекси утворення антитіл до рекомбінованих антигенів *Treponema pallidum Tr* 15 кДа, *Tr* 17 кДа, *Tr* 47 забезпечують 100% -відсоткову чутливість методу імуноблотингу при ранніх формах сифілісу.

Як видно з Табл. 3, при ранніх формах сифілісу, серед трепонемних реакцій:

- найбільш специфічним тестом є імуноблотинг;

- другу позицію займає РІФ;

- третю позиції займає РПГА.

Таблиця 2 - Середні індекси утворення антитіл у хворих на сифіліс за результатами імуноблотингу

Групи пацієнтів	Кількість пацієнтів у групі, <i>n</i>	<i>Tr IgM</i>	<i>Tr IgG</i>		
			<i>Tr</i> 15 кДа	<i>Tr</i> 17 кДа	<i>Tr</i> 47 кДа
Сифіліс первинний	30	$R > 2,6 \pm 1,6$	$R > 2,5 \pm 0,2$	$R > 6,5 \pm 0,3$	$R > 2,1 \pm 0,1$
Сифіліс вторинний	45	$R > 1,4 \pm 0,1$	$R > 3,5 \pm 0,1$	$R > 5,0 \pm 0,2$	$R > 2,5 \pm 0,3$
Сифіліс ранній прихований	140	$R > 1,2 \pm 0,1$	$R > 2,8 \pm 0,5$	$R > 5,2 \pm 0,1$	$R > 2,7 \pm 0,2$
Особи, які раніше хворіли на сифіліс (з негативним РМП і РЗК)	50	-	$R > 1,1$	$R > 1,4 \pm 0,1$	$R > 1,2 \pm 0,1$

Таблиця 3 - Специфічність трепонемних тестів у хворих на сифіліс

Групи пацієнтів	Кількість пацієнтів у групі, <i>n</i>	РІФ абс.	РІФ 200	РПГА	ІФА	Імуноблотинг
		%%				
Сифіліс первинний	30	98	99	96	98	99
Сифіліс вторинний	45	99	99	100	100	100
Сифіліс ранній прихований	140	97	99	97	96	100

Реакція ІФА з одночасним визначенням *IgM* та *IgG* до блідої трепонеми є найбільш ефективним методом діагностики первинного сифілісу, який поступається тільки імуноблотингу. Необхідно враховувати те, що при оцінюванні результатів дослідження РІФ можлива суб'єктивна оцінка реакції. РПГА є досить цінним діагностичним тестом при всіх формах сифілісу, але найбільш чутливим він є при пізніх формах сифілісу.

Позитивні результати ІФА повинні бути підтверджені дослідженням інших трепонемних тестів, наприклад РПГА, краще за імунобло-

тинг. РІФ рекомендується застосовувати у тих випадках, коли не співпадають результати ІФА, РПГА або імуноблотинг.

Аналізуючи вище наведені дані Табл. 2 і 3, можна дійти висновку, що ІФА, РПГА та імуноблотинг є високочутливими реакціями, які залишаються тривалий час (понад 2 роки) позитивними у хворих, що лікувались з приводу сифілісу. Ці особливості трепонемних тестів роблять неможливим їх використання при встановленні виліковності, а також у практиці акушерів-гінекологів.

Висновки

1. Реакція імуноблотингу має досить високі діагностичні можливості; так, метод імуноблотингу є більш чутливим методом діагностики сифілісу у порівнянні з РМП, РЗК і РПГА.

2. Імуноблотинг є більш інформативним у порівнянні з імуноферментними системами, які застосовуються для скринінгових досліджень, тому що визначає антитіла до окремих антигенів *T. pallidum*. Останнє свідчить про те, що даний метод є досить цінним при діагностиці прихованого сифілісу.

3. Метод імуноблотингу є дієвим методом дослідження при проведенні диференційного діагнозу між прихованим сифілісом і хибнопозитивними реакціями.

4. Імуноблотинг може бути додатковим або альтернативним іншим тестам (ІФА, РПГА) методом. Для включення його до медичних стандартів в якості референтного методу при діагностиці прихованого сифілісу необхідні подальші дослідження.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баркалова Е. Л. Диагностика нейросифилиса: современное состояние проблемы. Журнал дерматовенерологии и косметологии им. Н. А. Торсуева. 2006. №1-2 (12). С. 116 – 119.
2. Баркалова Е. Л. Прогнозування розвитку патологічного процесу при ранніх формах нейросифілісу : Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Харків, 2012. 25 с.
3. Дмитриев Г. А., Фриго Н. В. Сифилис. Дифференциальный клинико-лабораторный диагноз. М. : Медицина, 2004. 363 с.
4. Захаров С. В., Захаров В. К. Социальные и клинические особенности раннего скрытого сифилиса. Укр. журнал дерматовенерологии и косметологии. 2010. № 3 (58). С. 154 – 155.
5. Захаров В. К., Дюдюн А. Д., Захаров С. В. Прихований сифіліс : Навч. посібн. Дніпропетровськ, 2011. 121 с.
6. Катунин Г. Л., Китаева А. В., Фриго Н. В. [и др.]. Особенности клинического течения нейросифилиса на современном этапе. 3-й Всероссийский конгресс дерматовенерологов : Тез. научн. работ. Казань, 2009. С. 93.
7. Кубанова А. А., Фриго Н. В., Ротанов С. В. [и др.]. Опыт использования метода иммуноблотинга для диагностики сифилиса. Вестник дерматологии и венерологии. 2006. № 2. С. 3 – 11.
8. Кувишинов М. В., Чепуренко Н. В., Обрядина А. П. Комплексный подход к серологической диагностике сифилиса. Актуал. вопросы дерматовенерологии и косметологии: «Материалы 5 съезда дерматологов и венерологов республики Беларусь. Минск, 2006. С. 68 – 71.
9. Мавров Г. И., Щербакова Ю. В. Скрытый сифилис на современном этапе. Укр. журнал дерматовенерологии и косметологии. 2003. № 4 (11). С. 58 – 62.
10. Мавров Г. И., Счисльоник Н. В. Сучасні підходи до діагностики сифілісу із застосуванням реакції пасивної гемаглютинації (РПГА) : Метод. рекомен. К., 2008. 21 с.
11. Наказ МОЗ України «Сучасні підходи до лабораторної діагностики сифілісу» № 997 від 22.11.2013 р.
12. Соколовский Е. В., Фриго Н. В., Ротанов С. В. [и др.]. Руководство по лабораторной диагностике сифилиса в странах Восточной Европы. Вестник дерматологии и венерологии. 2008. № 5. С. 87 – 96.

13. Стратегии и лабораторные методы для усиления эпиднадзора за инфекциями, передаваемыми половым путем. 2012 г. (рабочая группа ЮНЭЙДС) ВОЗ по глобальному эпиднадзору за ВИЧ/СПИДОм и ИППП. – ВОЗ. – 2014. – 100 с.
14. Табуйка О., Мушет Г. К. К вопросу об оптимизации диагностики скрытого сифилиса. Укр. журнал дерматовенерологии и косметологии. 2011. № 1 (40). С. 78 – 82.
15. Фриго Н. В., Ротанов С. В., Несстеренко В. И. [и др.]. Результаты изучения диагностической эффективности новой тест-системы линейного иммуноферментного анализа “Inno-Lia TM Syphilis score”. Клиническая лабораторная диагностика. 2006. № 3. С. 36 – 41.
16. Фриго Н. В., Дударева Л. В., Ротанов С. В., Иванов Н. М. Иммуноблотинг в диагностике ранних форм сифилиса. Вестник дерматологии и венерологии. 2008. № 3. С. 57 – 62.
17. Kubanova A., Rotanov S., Frigo N. et al. The quality control system of syphilis serological diagnostics in Russian Federation. 18th Conference of ISSTDR in conjunction BASHH. 2806. 1.07.2009, London. P. 214.
18. Черешне В. А. Сифилис: иммунитет и лабораторная диагностика. Екатеринбург : Урал. ОРАН, 2006. 387 с.
19. Ebel A., Vaneste I., Cardinaels M. [et al]. Validation of the INNO-LIA syphilis kit as a confirmatory assay for Treponema pallidum antibodies. J. Clin. Microbiol. 2000. Vol. 38. P. 215 – 219.
20. Hagedorn H., Kramina-Hagedorn I., de Bosscherek M. [et al]. Evolution of INNO-LIA syphilis assay as a confirmatory Test of syphilis. J. Clin. Microbiol. 2002. Vol. 40. P. 973 – 978.
21. Sambri V., Marandony A., Eger C. [et al]. Western immunoblotting with five Treponema pallidum antigens for diagnosis by western blotting technique. CVI. 2001. Vol. 8. P. 534 – 539.

КЛИНИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

Захаров С. В., Захаров В. К.

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины»

Проведен сравнительный анализ специфичности и чувствительности трепонемных и нетрепонемных тестов у больных первичным, вторичным, ранним скрытым сифилисом и у пациентов, ранее лечившихся по поводу сифилиса с отрицательными результатами нетрепонемных тестов. Установлено, что наибольшей диагностической ценностью обладает иммунный блоттинг, особенно при раннем скрытом сифилисе. При первичном сифилисе диагностические возможности иммунного блоттинга уступают реакции флюоресценции.

Ключевые слова: вторичный сифилис, нетрепонемный тест, первичный сифилис, ранний скрытый сифилис, трепонемный тест.

CLINICAL EVALUATIONS OF SEROLOGICAL METHODS FOR DIAGNOSING SYPHILIS

Zakharov S. V., Zakharov V. K.

“Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health Care of Ukraine” SI

A comparative analysis of the specificity and sensitivity of treponemal and non-treponemal tests in patients with primary, secondary, early latent syphilis and in patients previously treated for syphilis with negative results of non-treponemal tests has been carried out. It has been established that immune blocking has the greatest diagnostic value, especially under early latent syphilis. Under primary syphilis, the diagnostic capabilities of immune blotting are inferior to the fluorescence reaction.

Keywords: early latent syphilis, non-treponemal test, primary syphilis, secondary syphilis, treponemal test.

Захаров Сергей Вячеславович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры кожных и венерических болезней ГУ «Днепропетровская медицинская академия».

Захаров Вячеслав Константинович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры кожных и венерических болезней ГУ «Днепропетровская медицинская академия».

zakhar.-s@iru